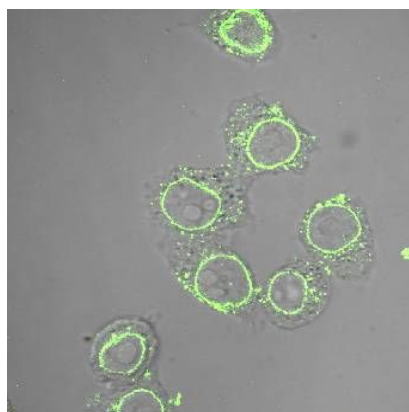
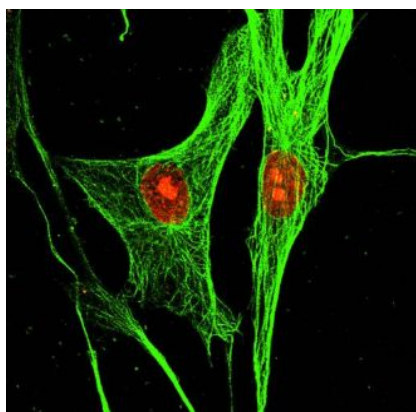
Ver.3.1JP(ISK10AU02)

GenomONE™-CAb

Antibody Delivery Reagent

HVJ Envelope IgG 抗体導入試薬（研究用）

データ集

石原産業株式会社

ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD.

生命技術開発部

フリーダイヤル 0120-409-816

TEL: 06-6444-7182 FAX: 06-6444-7183

E-mail : HVJ-E@iskweb.co.jp

URL: http://www.iskweb.co.jp/hvj-e

Ⅰ. *GenomONE-CAb* Antibody Delivery Reagent

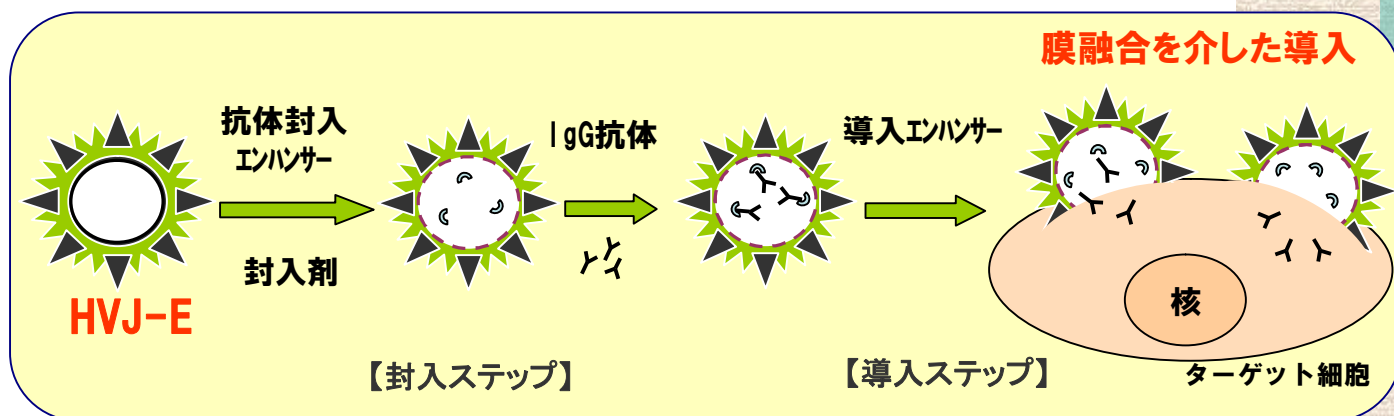
HVJ Envelope(HVJ-E)ベクターを用いてIgG抗体を細胞内に効率良く導入し、細胞内タンパク質の機能を解析するのに適したツールです

【はじめに】

抗体は細胞内には進入できないため、抗体を用いる実験は主として細胞外の分子が対象となってきました。しかし、生きた細胞の中の標的分子に抗体を作用させることが出来れば、細胞機能の解析や、診断・治療のターゲット分子探索などの分野で新しい研究の展開が可能となります。

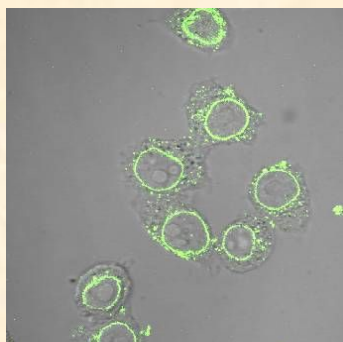
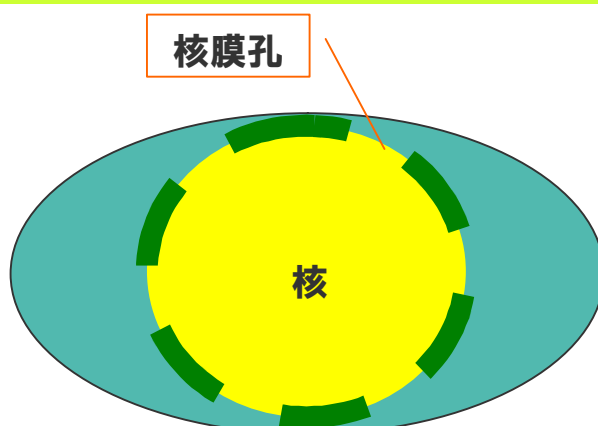
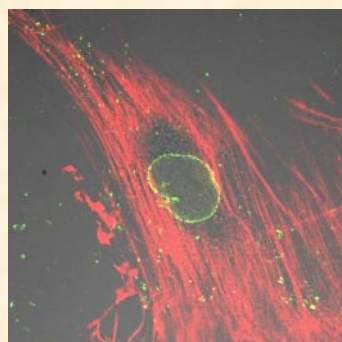
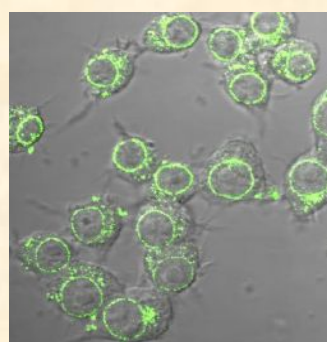
GenomONE-CAb Antibody Delivery Reagentは、そうしたニーズに応える次世代の細胞内抗体導入ツールです。不活化センダイウイルス(Hemagglutinating virus of Japan: HVJ)の膜融合能を利用したtransfectionツールであるHVJ Envelope (HVJ-E) の中に抗体を封入し、細胞に処理することで、細胞質に効率良くIgG抗体を導入することが出来ます。エンドサイトーシスによって抗体を導入する脂質ベースの試薬では難しかった全く新しい実験の方法論を提供します。

【導入原理】

本システムは、弊社が独自に開発したIgG抗体封入エンハンサー* の働きにより、2002年より販売しているHVJ-Eベクター(*GenomONE*、*GenomONE-Neo*)に比べて、HVJ-EへのIgG分子の封入効率が格段に向上しています。これに伴い、IgG分子を細胞質に高効率で導入することが可能となりました。

【封入ステップ】 抗体封入エンハンサーと封入剤の働きにより、IgG抗体がHVJ-Eの中に効率良く取り込まれます
【導入ステップ】 導入エンハンサーの働きにより抗体封入HVJ-Eベクターがターゲット細胞に結合、続いて起こる膜融合に伴って抗体が細胞質に導入されます

* *GenomONE-CAb*の抗体導入メカニズムや基本活性については、弊社の発表論文をご参照ください
Kondo Y. *et al.*: Efficient delivery of antibody into living cells using a novel HVJ envelope vector system. ***J. Immunol. Methods,* 332 , 10-17 (2008).**

II．生細胞への抗体導入事例（1）

抗核膜孔複合体抗体（抗NPCモノクローナル抗体）の導入

HeLa S3
(ATCC-CCL 2.2)

Hs68
(ATCC-CRL1635)
アクチンフィラメントを
ファロイジン（赤色）で染色した

Raw264.7
(ATCC-TIB-71)

生細胞に導入された抗NPC抗体は、その活性を保持したまま核膜上に移行し、抗原と特異的に結合した（核膜がリング状に染色されている）。

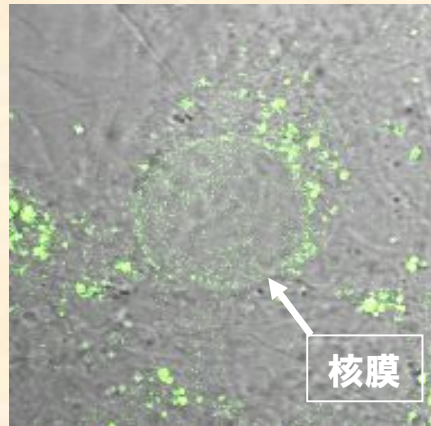
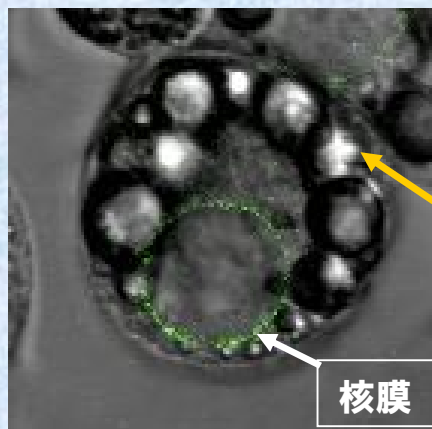
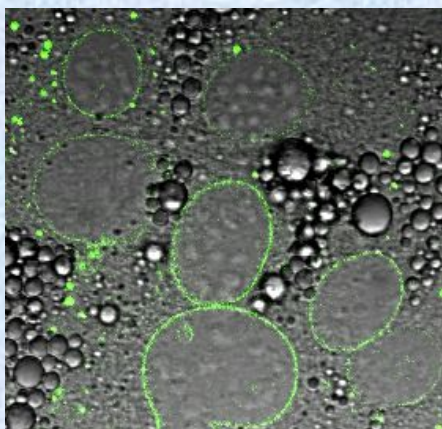
蛍光標識2次抗体は、必ずF（ab'）$_2$ Fragmentを使用してください。Wholeの抗体を用いると非特異的な結合が起こり、特異的な染色像が得られない場合があります。

【プロトコル】
細胞1×10^4 cells/well 10%FCS/DME (8-wellchambered coverglass; Nunc 15541)
↓ ***GenomONE-CAb*** を用いて生細胞に 抗NPC抗体（mAb, 2.5 μg）を導入
↓ 37℃, 2時間incubation
↓ 細胞wash (PBS)
↓ 細胞固定 (4% PFA 室温15分→PBS wash→0.2% Triton X-100室温5分→PBS wash→1%BSA/PBS室温10分
↓ Alexa Fluor 488-Goat Anti-Mouse IgG, F(ab')$_2$ Fragment (Invitrogen A11017)
↓ PBS wash
↓ 共焦点顕微鏡観察

【生細胞への導入に用いた抗NPC抗体】
Monoclonal Anti-Nuclear Pore Complex Proteins, Clone 414, Mouse IgG$_1$ (SIGMA, N8786)

II. 生細胞への抗体導入事例（２）

3T3-L1細胞（未分化型, 分化型）への抗NPC抗体の導入

(A) 未分化 3T3-L1細胞

(B) Adipocyteに分化した3T3-L1細胞

未分化細胞(A)のみならず、脂肪細胞に分化した細胞(B)においても抗NPC抗体が核膜上の抗原と特異的に結合することが示された

【抗体】

Monoclonal Anti-Nuclear Pore Complex Proteins, Clone 414, Mouse IgG_1 (SIGMA, N8786)

【プロトコル】

3T3-L1細胞　mouse embryo fibroblast (ATCC-CL-173)播種,
　1×10^4cells/well/8-well chambered coverglass (Nunc155411), 10%FCS-DMEM
↓ 培養2日後(confluent), MDI*添加により分化誘導, *0.5mM Methylisobutylxanthine, 1μM Dexamethasone, 10μg/mL Insulin
↓ 分化誘導2日後, 10%FCS-DMEM (＋Insulin)にて培地交換,　以後、2日おきに培地交換
↓ 分化誘導7日後、***GenomONE-CAb***を用いて生細胞に抗NPC抗体(mAb, 2.5μg)を導入
↓ 37℃, 4時間incubation
↓ 細胞固定(4% PFA 室温15分, 0.2% Triton X-100 室温5分)
↓ Alexa Fluor 488-Goat Anti-Mouse IgG, $F(ab')_2$ <Invitrogen A11017>, 2μg/mL ×200μL, 室温1時間
↓ PBS(-)wash
共焦点顕微鏡観察

II. 生細胞への抗体導入事例（3）
Hs68細胞への抗α-tubulin抗体の導入

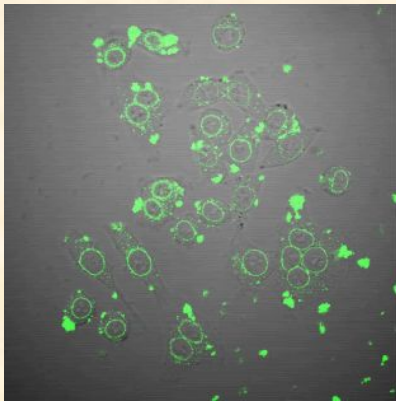
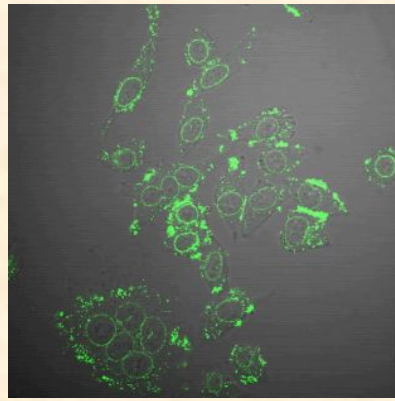
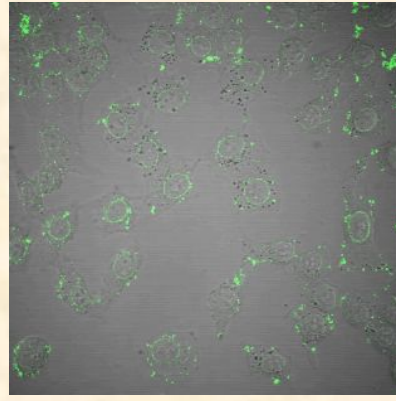
Tubulinフィラメントに対する特異的な結合が認められた
（核はSYTO82を用いて赤色に染色）

蛍光標識2次抗体は、必ずF(ab')$_2$ Fragmentを使用してください。Wholeの抗体を用いると非特異的な結合が起こり、特異的な染色像が得られない場合があります。

【抗体】
Monoclonal Anti-α-tubulin, Clone DM1A, Mouse IgG_1 (SIGMA, T6199)
【プロトコル】
Hs68: Human foreskin fibroblast（ATCC-CRL-1635), 1×10^4 cells/well, 0.5%FCS/DMEM
(8-well chambered coverglass; Nunc 155411)
↓ ***GenomONE-CAb***を用いて生細胞に抗α-tubulin抗体（5μg）を導入
↓ 37℃, 2時間incubation
↓ 細胞wash (PBS)
↓ 細胞固定(4% PFA 室温15分, 0.2% Triton X-100 室温5分, 1%BSA o/n)
↓ Alexa Fluor 488-Goat Anti-Mouse IgG, F(ab')$_2$ <Invitrogen A11017>
↓ PBS wash
↓ SYTO 82 (Invitrogen S11363)を処理し核酸を染色
↓ 共焦点顕微鏡観察

Ⅲ. 導入抗体の細胞内での安定性

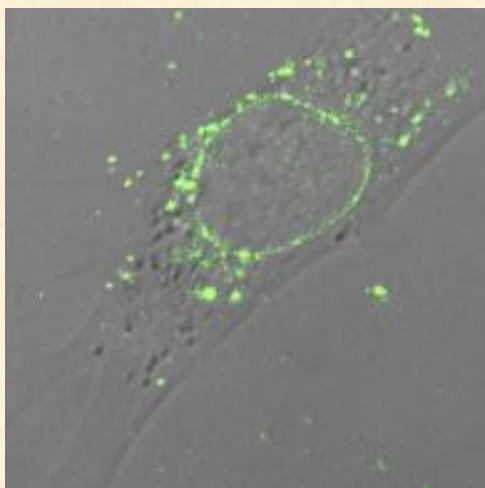
抗NPC抗体／共焦点レーザー顕微鏡観察

HeLa S3 cells

抗体導入後の時間

抗NPC抗体は、***GenomONE-CAb*** による導入２時間以内に核膜上の抗原に特異的に結合し、その結合は少なくとも24時間は安定であった

Ⅳ. 蛍光標識した抗NPC抗体の生細胞への導入

ライブセル イメージングへの応用

Hs68細胞

GenomONE-CAb を用いてAlexaFluor488標識抗NPC抗体*を導入し、
2時間後に固定操作を行うことなく共焦点顕微鏡で観察した。
核膜上の抗原に対する抗体の特異的な結合が認められた。

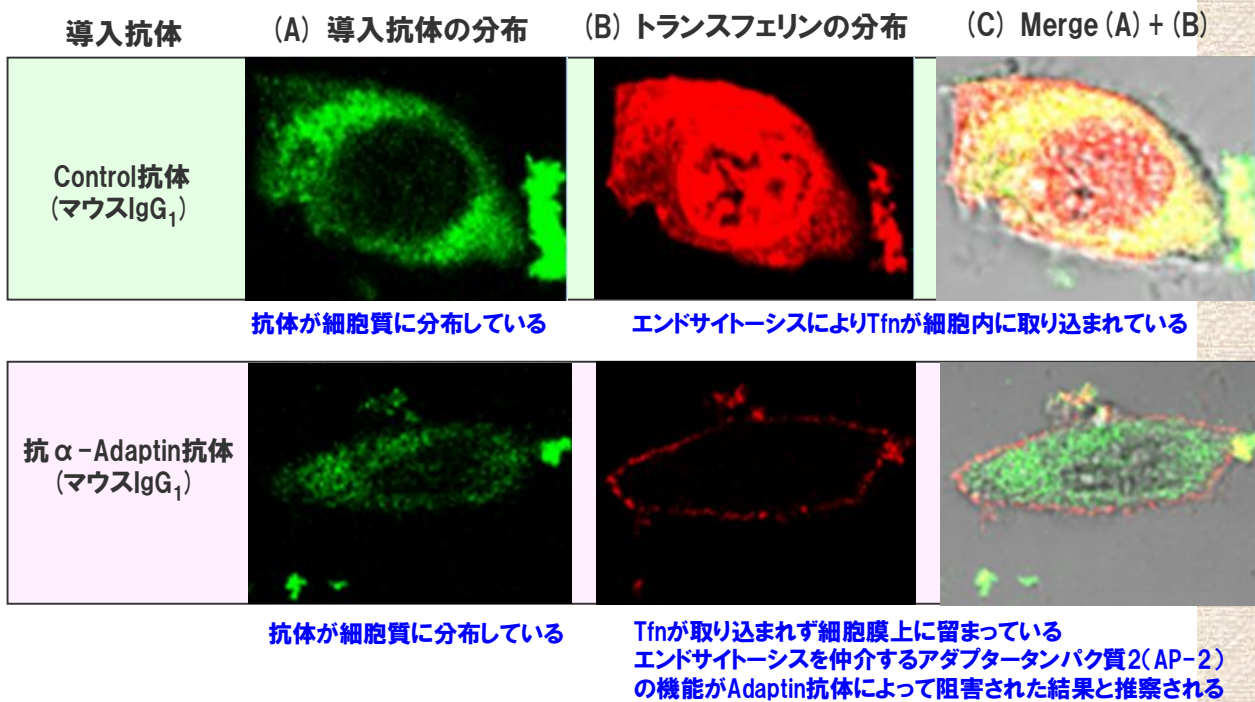
"Monoclonal Antibody Labeling Kit" (invitrogen, 20181)を用いて調製

(注意事項)
蛍光標識抗体やポリクローナル抗体(精製IgG)を用いる場合を用いる場合、細胞表面への非特異的な結合が起こり、細胞内への導入効率が低くなる場合があります。
その場合は、製品取扱説明書のトラブルシューティングの項をご参照の上、実験条件の最適化をしてください。

V．抗体の細胞内導入による機能解析（1）

抗体導入による（Tfn）のエンドサイトーシス阻害

HeLa S3細胞に予め抗Adaptin抗体を導入することにより、トランスフェリン（Tfn）のエンドサイトーシスが阻害された（共焦点レーザー顕微鏡観察）。

導入抗体	(A) 導入抗体の分布	(B) トランスフェリンの分布	(C) Merge (A)+(B)
Control抗体 (マウスIgG$_1$)			
	抗体が細胞質に分布している	エンドサイトーシスによりTfnが細胞内に取り込まれている	
抗α-Adaptin抗体 (マウスIgG$_1$)			
	抗体が細胞質に分布している	Tfnが取り込まれず細胞膜上に留まっている エンドサイトーシスを仲介するアダプタータンパク質2（AP-2）の機能がAdaptin抗体によって阻害された結果と推察される	

【プロトコル】
HeLa S3細胞　1×10^{4}cells/well, 10%FBS-DMEM (8-wellchambered coverglass; Nunc155411)
↓ ***GenomONE-CAb*** を用いて1μgの抗α-adaptin抗体（abcam, ab2730）またはControl抗体（Sigma M9269)を導入
↓ 37℃, 4時間incubation
↓ 無血清Mediumに置換
↓ AlexaFluor 594 conjugated transferrin (Invitrogen, T13343)を添加
↓ 37℃, 15分incubation
↓ Cold 10%FBS-medium, cold PBS(-)洗浄
↓ 細胞固定(4% PFA 室温15分, PBS(-) wash, 0.2% Triton X-100室温5分, PBS(-) wash, 1%BSA室温10分)
↓ AlexaFluor 488-Goat Anti-Mouse IgG, F(ab')$_2$ fragment, 1/500 dilution　(Invitrogen, A11017)
↓ PBS(-) wash x3
↓ 共焦点レーザー顕微鏡観察

Ⅴ. 抗体の細胞内導入による機能解析（２）

【実験1】抗体導入によるNF-κBの核内移行阻害

Raw264.7細胞に抗NF-κB抗体あるいは抗NPC（核膜孔複合体タンパク質）抗体を導入することによりNFκBの核内移行が阻害された（共焦点レーザー顕微鏡観察）。

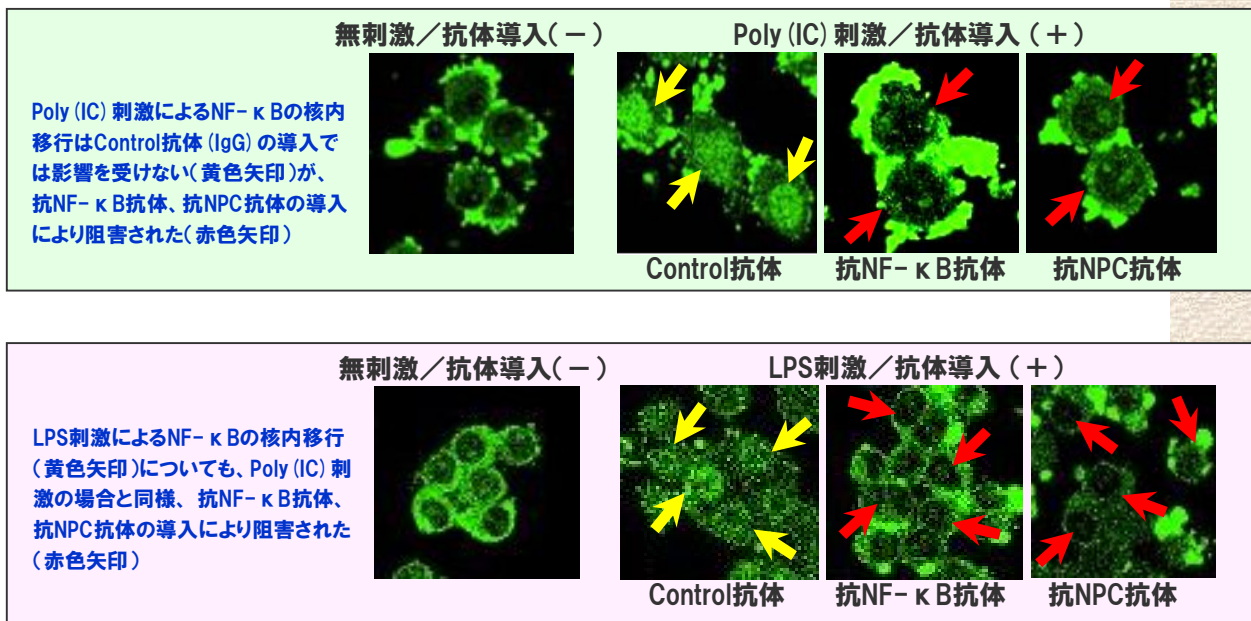
無刺激／抗体導入(－)　　Poly (IC) 刺激／抗体導入（＋）

Poly (IC) 刺激によるNF-κBの核内移行はControl抗体 (IgG) の導入では影響を受けない(黄色矢印)が、抗NF-κB抗体、抗NPC抗体の導入により阻害された(赤色矢印)

Control抗体　抗NF-κB抗体　抗NPC抗体

無刺激／抗体導入(－)　　LPS刺激／抗体導入（＋）

LPS刺激によるNF-κBの核内移行(黄色矢印)についても、Poly (IC) 刺激の場合と同様、抗NF-κB抗体、抗NPC抗体の導入により阻害された(赤色矢印)

Control抗体　抗NF-κB抗体　抗NPC抗体

【実験1 プロトコル】

Raw264.7細胞(ATCC TIB-71) 1-3×10^4cells/well, 10%FBS-DMEM (8-well chambered coverglass; Nunc155411)

↓ ***GenomONE-CAb*** を用いてControl抗体(Sigma, M9269)、anti-NF-κB抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Sc-8008) またはanti-NPC抗体(Sigma, N8786)を生細胞に導入(何れもmouse monoclonal antibody, IgG_1; 0.8-1 μg/well)

↓ 37℃, 2-3時間incubation

↓ Poly(IC)(最終濃度100 μg/mL)またはLPS (10 μg/mL)を添加、200 μL/well

↓ 37℃, 30分間incubation(LPSは15分間incubation)

↓ Cold 10%FBS-medium, cold PBS(-)で洗浄

↓ 細胞固定(4% PFA 室温15分, PBS(-) wash, 0.2% Triton X-100室温5分, PBS(-) wash, 3%BSA室温10分)

↓ Rabbit anti-NF-κB p65(c)抗体(免疫生物研究所より分与, #8883); 0.4-4 μg/mL, 3% BSA溶液

↓ 室温, 1時間incubation

↓ PBS(-)洗浄 x3

↓ AlexaFluor 488-Goat Anti-Rabbit IgG, $F(ab')_2$ fragment, 1/500 dilution (Invitrogen, A11070)

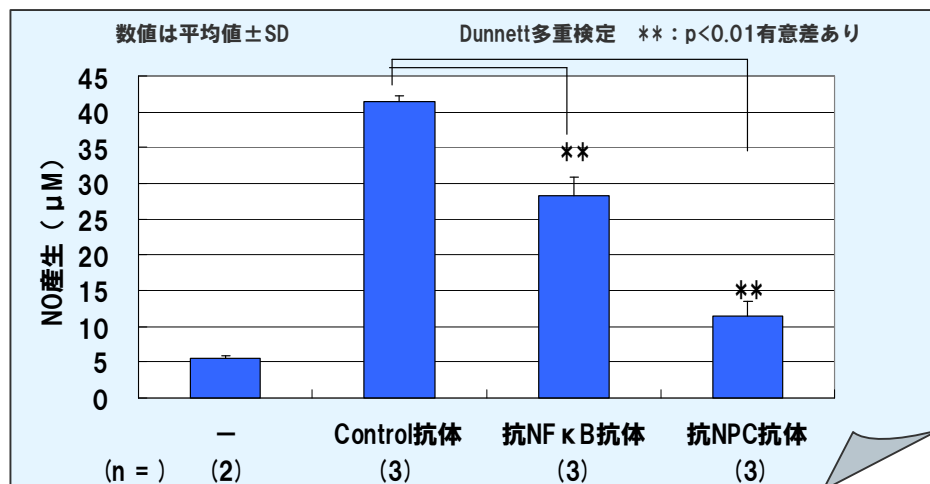
↓ PBS(-)洗浄 x3

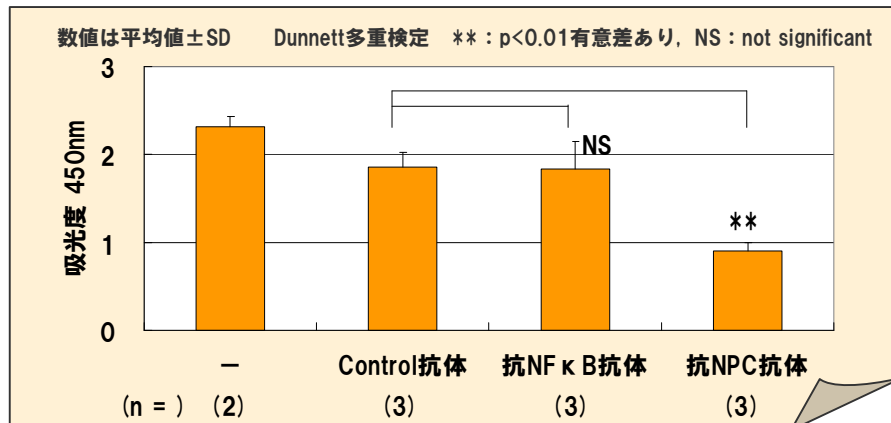
↓ 共焦点レーザー顕微鏡観察

（本実験は、㈱免疫生物研究所との共同研究として実施されました。石川 清博士をはじめご関係者に深謝いたします。）

V. 抗体の細胞内導入による機能解析（3）

【実験2】抗体導入によるNO産生阻害

Raw264.7細胞に抗NF-κB抗体あるいは抗NPC（核膜孔複合体タンパク質）抗体を導入することにより、Nitric Oxide（NO）産生の有意な阻害が認められた。

【実験3】抗体導入による細胞増殖阻害

Raw264.7細胞に抗NPC抗体を導入すると有意な細胞増殖阻害が認められた。一方、抗NF-κB抗体の導入では阻害効果はみられなかった。

【実験2、実験3　プロトコル】

Raw264.7細胞(ATCC TIB-71)　4×10^4cells/well, 10%FBS-DMEM (96-well plate; IWAKI 3860-096), overnight incubation

↓ ***GenomONE-CAb*** を用いてControl抗体(Sigma, M9269)、anti-NF-κB抗体（Santa Cruz Biotechnology Inc., Sc-8008）またはanti-NPC抗体(Sigma, N8786)を生細胞に導入(何れもmouse monoclonal antibody, IgG_1; 0.8-1μg/well)

↓ 37℃, 4時間incubation

↓【実験2】

↓ LPSを添加(最終濃度1μg/mL)、200μL/well

↓ 37℃, 19時間incubation →

↓ 上清回収; 150μL/well(別のプレートに移す)

↓ Griess試薬(×2濃度), 50μL/well添加

↓ 室温, 10分間静置

↓ 540nm吸光度測定

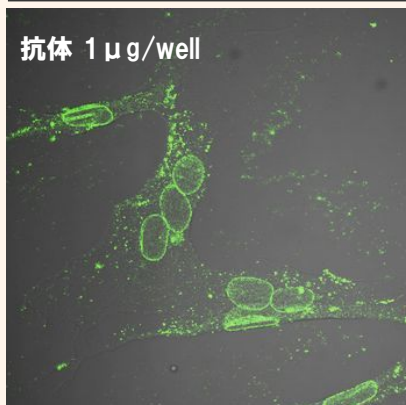
【実験3】

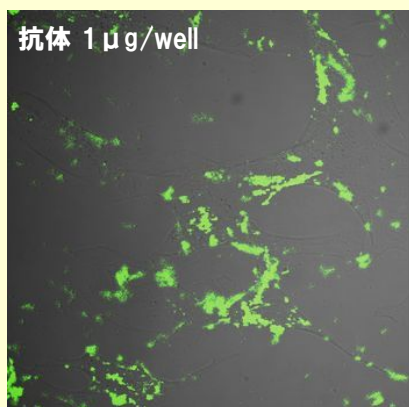
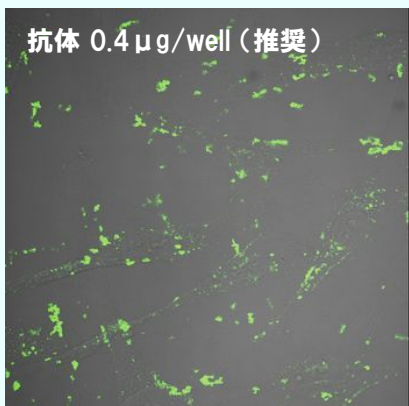
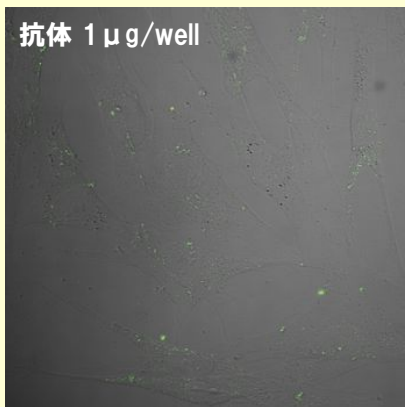
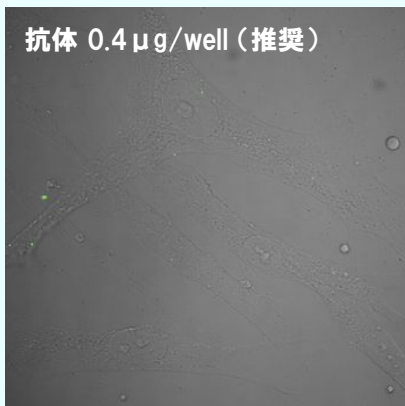
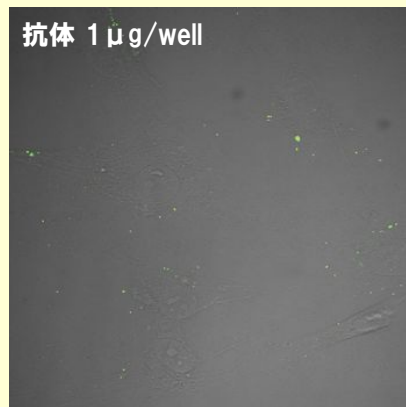
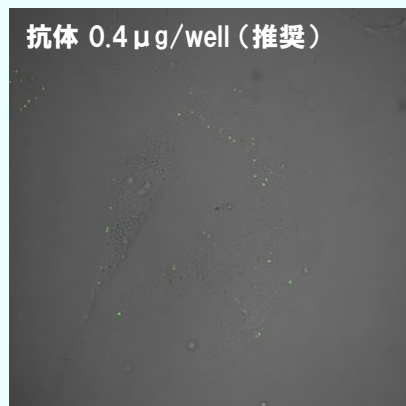
↓ 生細胞数測定試薬SF(ナカライテスク; 07553-44)添加　20μL/well

↓ 37℃, 1時間incubation

↓ 450nm吸光度測定

Ⅵ. 他社タンパク質導入試薬との性能比較（１）
Hs68細胞（抗NPC抗体導入）／共焦点レーザー顕微鏡観察

GenomONE- CAb

導入した抗NPC抗体が核膜上の抗原と特異的に結合し、明瞭な蛍光像が観察された

P社 試薬A	G社 試薬B	A社 試薬C

細胞辺縁に非特異的な蛍光の凝集がみられるのみで、核膜上のNPC特異的な蛍光はほとんど認められない

核膜上のNPC特異的な蛍光は認められない

核膜上のNPC特異的な蛍光は認められない

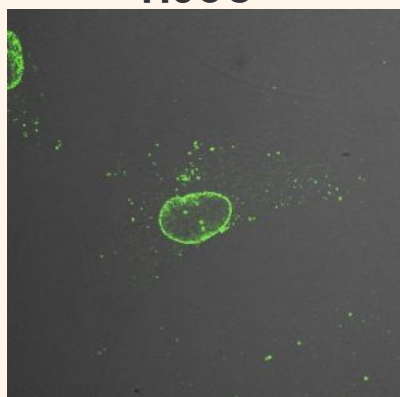
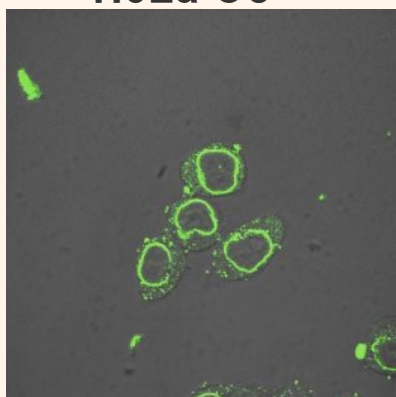
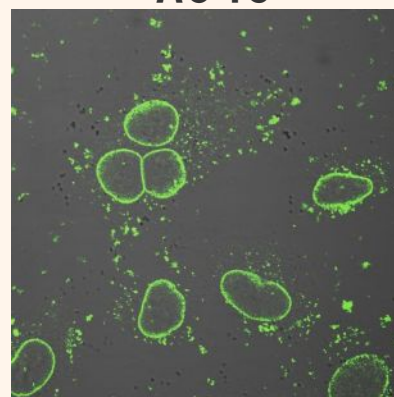
【細胞】Hs68: Human, foreskin fibroblast（ATCC-CRL-1635), 5×10^3 cells/well
【抗体】Monoclonal Anti-Nuclear Pore Complex Proteins, Clone 414, Mouse IgG_1（SIGMA, N8786）

Ⅵ. 他社タンパク質導入試薬との性能比較（2）
抗NPC抗体導入／共焦点レーザー顕微鏡観察

GenomONE-CAb

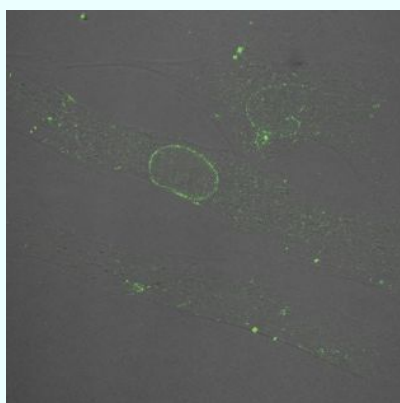
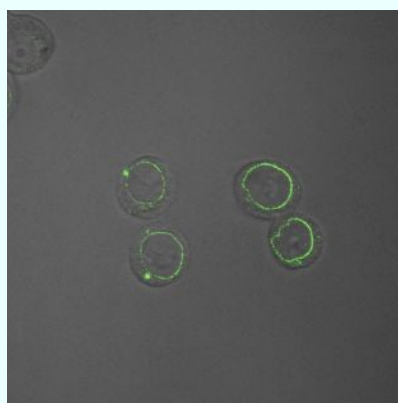
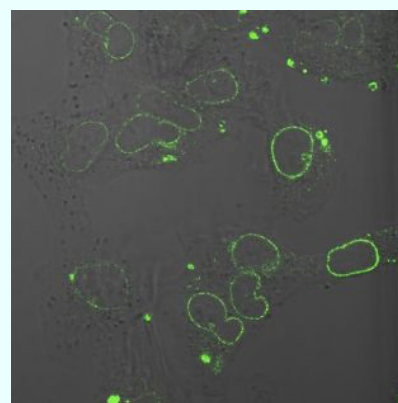
抗体 1.1μg/well

導入した抗NPC抗体が核膜上の抗原と特異的に結合し、明瞭な蛍光像が観察された

Hs68

HeLa S3

A549

O社 抗体導入試薬

抗体 1.0μg/well

何れの細胞株においても抗NPC抗体の導入効率は***GenomONE-CAb***よりも低い傾向にあった

Hs68

HeLa S3

A549

【細胞】Hs68: Human, foreskin fibroblast（ATCC CRL-1635）, 5×10^3 cells/well
HeLa S3: Human, cervical epithelioid carcinoma （ATCC CCL 2.2）, 2×10^4 cells/well
A549: Human, lung carcinoma （ATCC CCL-185）, 2×10^4 cells/well
【抗体】Monoclonal Anti-Nuclear Pore Complex Proteins, Clone 414, Mouse IgG_1（SIGMA, N8786）

Ⅶ. 適用可能な抗体の種類

以下の種類のIgGのHs68細胞(Human foreskin fibroblast; ATCC CRL-1635)
への導入を確認しています。

動物種	IgG種*[1]	HVJ-Eへの封入効率*[2]	HS-68細胞への導入効率*[3]
マウス	pAb	◎	△
	IgG1	◎	◎
	IgG2a	○	○
	IgG2b	◎	△
	IgG3	○	△
ラット	pAb	△	△
	IgG1	◎	○
	IgG2a	△	△
	IgG2b	○	○
	IgG2c	△	△
ヒト	IgG1	◎	○
	IgG2	◎	○
	IgG3	△	△
	IgG4	◎	○
ウサギ	pAb	○	○
ヤギ	pAb	△	△

*[1]: pAb: polyclonal antibody、その他はmonoclonal antibody
*[2]: HVJ-Eへの抗体の封入効率： ◎; 40%以上 ○;20%以上 △;20%未満
*[3]: HS-68細胞への抗体導入: ◎; 導入され易い ○; 導入可能 △; 効率は低いが導入可能

Ⅷ. IgG抗体の導入が可能な細胞の例

Origin	Cell Line	Cell Type	Antibody Type
Cancer, Adherent			
Human	HeLa S3	cervical epithelioid carcinoma	mouse IgG pAb mouse IgG1mAb
Human	A549	lung carcinoma	mouse IgG1mAb
Human	SAS	tongue carcinoma	mouse IgG pAb
Human	HT1080	fibrosarcoma	mouse IgG pAb
Human	MCF-7	mammary carcinoma	mouse IgG2a mAb
Mouse	P19	embryonal carcinoma	mouse IgG pAb
Mouse	Raw264.7	leukemic monocyte	mouse IgG pAb
Cancer, Non-adherent			
Human	Jurkat	T cell leukemia	mouse IgG1 mAb
Mouse	P3-X63-Ag8.653	myeloma	mouse IgG1 mAb
Normal, Adherent			
Human	WI-38	lung fibroblast	mouse IgG1 mAb
Human	Hs68	skin fibroblast	mouse IgG1 mAb
Mouse	3T3-L1	embryo fibroblast, undifferentiated	mouse IgG1 mAb
Mouse	3T3-L1, adipocyte	embryo fibroblast, differentiated	mouse IgG1 mAb
Mouse	BNL CL2	embryo hepatocyte	mouse IgG1 mAb
Hamster	BHK-21	kidney fibroblast	mouse IgG1 mAb
Normal, Primary cultured			
Human	HAEC	aortic endothelial	mouse IgG1 mAb

pAb: polyclonal antibody, mAb: monoclonal antibody

Reference

Kondo, Y. *et al.*: Efficient delivery of antibody into living cells using a novel HVJ envelope vector system. ***J. Immunol. Methods,*** 332,10-17(2008).

Kondo,Y. *et al.:* Efficient delivery of antibody into living cells using hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope. ***Curr. Protoc. Immunol.,*** Chapter 2, Unit 2.16, 1-12 (2010).

Balasubramanian, S. *et al.*: Hypertrophic stimulation increases beta-actin dynamics in adult feline cardiomyocytes. ***PLoS One***., 5(7), e11470 (2010).

Ⅸ. *GenomONE-CAb* Antibody Delivery Reagentの適用

GenomONE-CAb Antibody Delivery Reagent は
こんな実験を可能にします・・・

- **細胞内タンパク質の機能解析**

・抗体を生細胞内に導入して標的分子の局在を観察する
・抗体を生細胞内に導入して標的分子の機能を抑え、その働きを解明する
・ライブセル イメージングを行う

- **細胞内抗原に反応する抗体のスクリーニング**

・生細胞内のintactな抗原に結合し中和活性を示す抗体のスクリーニングを行う

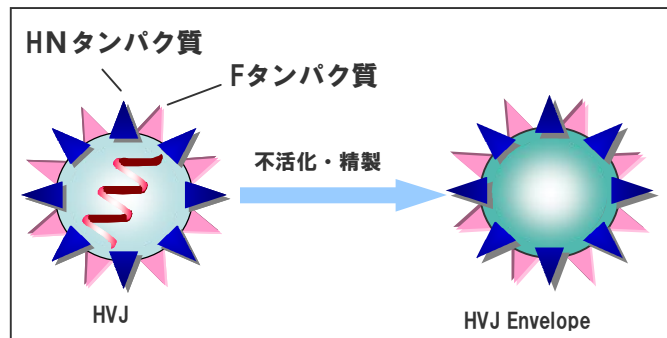
- **検査、診断、治療への応用**

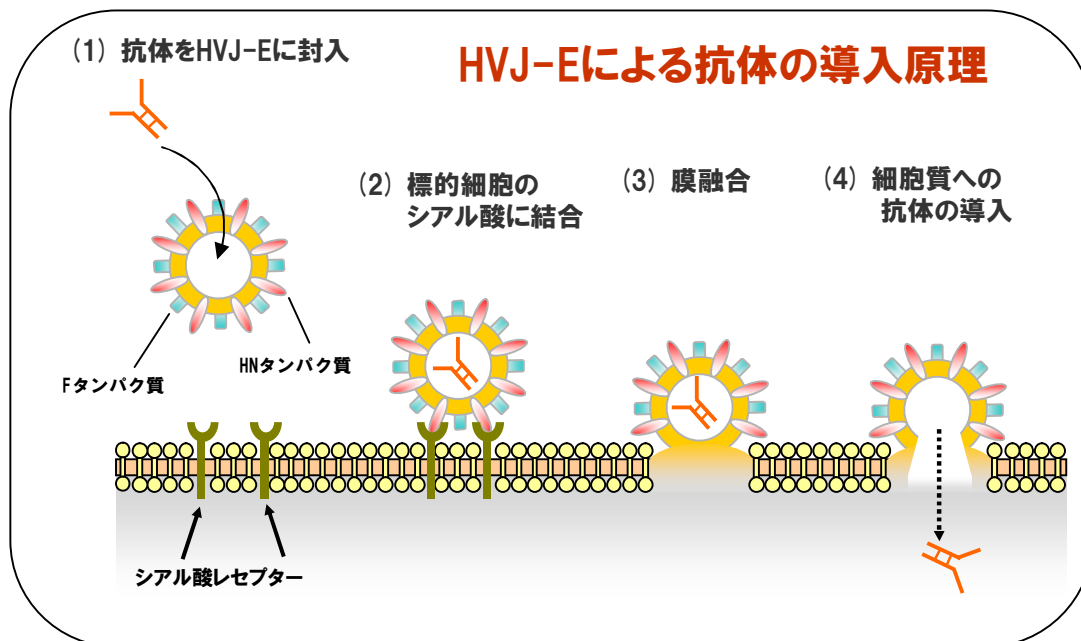
・生細胞内の標的分子を検出する抗体を用いた検査・診断薬を開発する
・細胞内の標的分子に作用して治療効果を示す次世代抗体医薬を創製する

細胞内抗体導入法のメリット（既存のノックアウト法とここが違う）

- RNAiなどの転写後gene-silencing法と異なり、タンパク質ータンパク質相互作用や翻訳後修飾（糖鎖の付加等）を認識する特異的な阻害が期待出来る
- RNAi法のoff-target効果のようなnon-specificな反応が起こりにくい
- 遺伝子導入・発現法とは異なり、効果を示すのに十分な量を短時間にかつ簡単に導入することが出来、その応用範囲が広い

X．Appendix

HVJ Envelope (HVJ-E) とは・・・

HVJ Envelope (HVJ-E) は、センダイウイルス（HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)を完全に不活化･精製し、外膜の細胞膜融合能だけを残した粒子です。ヒトや実験動物への感染性や増殖性はありません。特殊な操作や設備を必要とせず、通常の実験室レベルで安全に使用できます。

Kaneda, Y., *et al.*: Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system.
Molecular Therapy, 6, 219-226 (2002).

【お問い合わせ先】
ISK 石原産業株式会社
ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD.
〒550-0002　大阪市西区江戸堀1丁目3番15号
1-3-15 Edobori, Nishi-ku, Osaka 550-0002, Japan.
フリーダイヤル 0120-409-816
TEL：06-6444-7182　FAX：06-6444-7183
E-MAIL：HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e